

No title available.

Patent Number: DE19622090

Publication date: 1997-12-04

Inventor(s): PFITSCHLER ELKE (DE); WEISHEIT RALPH DR (DE)

Applicant(s):: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE)

Requested
Patent: ☐ DE19622090Application
Number: DE19961022090 19960531Priority Number
(s): DE19961022090 19960531IPC
Classification: G01N33/50 ; G01N33/72 ; G01N21/75EC Classification: C12Q1/00, C12Q1/32, G01N33/52, G01N33/70, G01N33/72BEquivalents: AU3093597, CN1216614, CZ9803895, ☐ EP0906570 (WO9745733), B1,
JP11510902T, NZ331491, PL330220, ☐ WO9745733

Abstract

The present invention relates to a process for determining an analyte in a sample containing free haemoglobin by optical bichromatic measurement for a main and a secondary measuring wave length. A secondary measuring wave length of above 475 nm is used containing absorption bands of haemoglobin.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 22 090 A 1**

⑤① Int. Cl. 6:
G 01 N 33/50
G 01 N 33/72
G 01 N 21/75

②① Aktenzeichen: 196 22 090.4
②② Anmeldetag: 31. 5. 96
④③ Offenlegungstag: 4. 12. 97

DE 196 22 090 A 1

⑦① Anmelder:
Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim, DE

⑦④ Vertreter:
H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

⑦② Erfinder:
Pfitschler, Elke, 82386 Oberhausen, DE; Weisheit,
Ralph, Dr., 82362 Weilheim, DE

⑤④ Verfahren zur Beseitigung von Hämoglobinstörungen bei der Analyse medizinischer Proben

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer freies Hämoglobin enthaltenden Probe durch optische bichromatische Messung bei einer Haupt- und einer Nebenmeßwellenlänge, wobei man eine Nebenmeßwellenlänge von oberhalb 475 nm verwendet, bei der sich Absorptionsbanden von Hämoglobin befinden.

DE 196 22 090 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 10. 97 702 049/376

9/24

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer freien Hämoglobin enthaltenden Probe, wobei die Bestimmung durch eine optische bichromatische Messung bei einer Haupt- und einer Nebenmeßwellenlänge erfolgt. Insbesondere ist dieses Verfahren zur Bestimmung der Parameter Ammoniak, Creatinkinase und Isoenzymen davon und Lactat-Dehydrogenase und Isoenzymen davon in einer medizinischen Probe, z. B. einer Serum- oder Plasmaprobe, geeignet.

Es ist allgemein bekannt, daß durch Hämolyse die Bestimmung einer Vielzahl von Analyten in teilweise erheblichem Maße gestört ist. Um dennoch unverfälschte Meßwerte zu erhalten, wurden in der Vergangenheit unterschiedliche Verfahren zur Hämolyse-Entstörung publiziert.

Eines dieser Verfahren besteht darin, daß bei der Messung in automatisierten Analysegeräten neben der ersten Meßwellenlänge (Hauptmeßwellenlänge) häufig eine zweite Meßwellenlänge (Nebenmeßwellenlänge) benutzt wird, mittels derer der Störeinfluß interferierender Substanzen wie Hämoglobin, Bilirubin und Lipämie beseitigt oder zumindest minimiert werden kann.

Eine Anforderung dabei ist, daß die zu messende Substanz bei der Nebenwellenlänge möglichst wenig absorbiert, die Störsubstanz dagegen möglichst in gleicher Höhe absorbiert wie bei der Hauptwellenlänge (Praxistechnik: Photometer für die Ärztliche Praxis, Deutscher Ärzteverlag 1977, Seiten 41—42).

Im DIA-Letter (Boehringer Mannheim) Nr. 70 (1985) wird erwähnt, daß die Nebenwellenlänge möglichst nahe der Hauptwellenlänge liegen sollte, da in der Regel dann die Störsubstanz bei Haupt- und Nebenwellenlänge ähnliche Extinktionen aufweist.

In Clin Chem 25/6, 951—959 (1979) wird darauf verwiesen, die Nebenwellenlänge so zu wählen, daß diese nahe des Absorptionsminimums des Chromogens und nahe des Absorptionsmaximums der Störsubstanz liegen sollte. In diesem Zusammenhang wird für die Glucosebestimmung (Hauptwellenlänge 340 nm) eine Nebenwellenlänge von 380 nm empfohlen, da hier die Störsubstanzen ähnlich absorbieren wie bei 340 nm.

Kritisch wird dagegen in Eur J Clin Chem Clin Biochem 31/9, 595—601 (1993) gesehen, UV-Tests mit einer Nebenwellenlänge von 380 nm zu vermessen, da in diesem Fall die Umwandlung von Hb-O₂ in Meth-Hb zu spektralen Veränderungen bei 380 nm und damit zu Fehlmessungen führt. Für Tests, die auf Messung von NAD(P)H-Abnahme oder -Zunahme beruhen, wird deshalb eine Nebenwellenlänge empfohlen, die hinter der sogenannten Soret-Region liegt, wie z. B. 475 nm.

Alle zuvor beschriebenen Verfahren beziehen sich auf die Entstörung von durch Hämolyse verursachten Fehlmessungen. Mit der Bereitstellung von Blutersatzmitteln auf Basis von Hämoglobin stellt sich die Frage nach der Beseitigung von Störungen durch natives oder synthetisches Hämoglobin bzw. Hb-analogen Verbindungen noch weit brisanter als bisher. Solche Störungen treten dann nämlich einerseits auch in nicht hämolytischem Probenmaterial und andererseits auch in weit höherem Grad auf als bei nativer Hämolyse, da bei Therapie mit Blutersatzmitteln der Hb-Gehalt im Blutserum oder -plasma bis zu 2.000 mg/dl betragen kann.

Außerdem wurde festgestellt, daß bei der Messung bestimmter Analyten, wie etwa Ammoniak, Creatinkinase und Isoenzymen davon sowie Lactat-Dehydrogenase und Isoenzymen davon die Verwendung einer Nebenmeßwellenlänge von 475 nm oder höher, z. B. bei 480, 505, 600, 660 oder 700 nm, nicht ohne weiteres eine ausreichende Hämoglobinentstörung erzielt. Da diese Parameter im Rahmen der Herz-Kreislauf- und Notfalldiagnostik sowie der Diagnostik von mit Blutersatzmitteln therapierten Patienten von essentieller Bedeutung sind, war es die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein einfaches Verfahren zur Beseitigung von Störungen bereitzustellen, die durch natives Hämoglobin oder auf synthetischem Hb- bzw. Hb-analogen Verbindungen basierenden Blutersatzmitteln, insbesondere bei Messung der oben genannten Analyten hervorgerufen werden.

Gelöst wurde die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe durch ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer freien Hämoglobin enthaltenden Probe durch optische bichromatische Messung bei einer Haupt- und einer Nebenmeßwellenlänge, wobei daß man eine Nebenmeßwellenlänge von oberhalb 475 nm verwendet, bei der sich Absorptionsbanden von Hämoglobin befinden.

Bevorzugte Nebenmeßwellenlängen für das erfindungsgemäße Verfahren liegen im Bereich von 546 ± 10 nm, insbesondere 546 ± 5 nm sowie im Bereich von 570 ± 10 nm und insbesondere 570 ± 5 nm. Am meisten bevorzugt sind die Wellenlängen 546 bzw. 570 nm.

Die Auswahl der erfindungsgemäßen Wellenlängen als Nebenmeßwellenlängen war überraschend, da bei der aus dem Stand der Technik (Boehringer Mannheim/Hitachi-Applikation) bekannten Nebenmeßwellenlänge von 405 nm, bei welcher ebenfalls eine Absorption durch Hämoglobin stattfindet, gerade die größten Störungen durch Hämoglobin erhalten werden. Weiterhin wird in der oben genannten Publikation Eur J Clin Chem Clin Biochem darauf hingewiesen, daß zur Entstörung von Hämoglobin gerade eine Nebenmeßwellenlänge verwendet werden sollte, die hinter der Soret-Region (wo die Hauptabsorptionsbanden von Hämoglobin sind) liegt, so daß es allenfalls naheliegend wäre, als Nebenmeßwellenlänge solche Wellenlängen zu wählen, wo sich überhaupt keine Absorptionsbanden von Hämoglobin befinden.

Die erfindungsgemäße Entstörungsmethode ist für Verfahren geeignet, bei denen die Bestimmung des Analyten durch optische Messung erfolgt, insbesondere durch optische Messung bei einer Hauptwellenlänge im UV-Bereich. Besonders bevorzugt wird das Verfahren bei Tests durchgeführt, die auf einer Messung der Zu- oder Abnahme der Konzentration von NADH oder NADPH in der Probe beruhen. In diesem Fall verwendet man bevorzugt eine Hauptmeßwellenlänge im Bereich von 340 ± 10 nm.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich zur Bestimmung beliebiger Proben, in denen freies Hämoglobin vorliegt. Beispiele für solche Proben sind hämolytische Serum- oder Plasmaproben oder Proben, die ein Blutersatzmittel enthalten. Beispiele für Blutersatzmittel, die im Sinne der vorliegenden Erfindung unter den Begriff "freies Hämoglobin" fallen, sind derivatisierte, polymerisierte, modifizierte oder quervernetzte Derivate von Hämoglobinen, insbesondere von Humanhämoglobin oder Rinderhämoglobin, z. B. DCL-Hämoglobin (Diaspir-

incrosslinked-Hämoglobin), sowie rekombinant hergestelltes Hämoglobin.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens bestimmt man den Gehalt eines Analyten, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ammoniak, Creatinkinase und Isoenzymen davon und Lactat-Dehydrogenase und Isoenzymen davon.

Die Bestimmung von Ammoniak durch das erfindungsgemäße Verfahren erfolgt vorzugsweise nach der enzymatischen UV-Methode (Da Fonseca-Wollheim F., Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 11 (1973) 421).

Die Bestimmung der Creatinkinase (CK) erfolgt vorzugsweise nach der "Optimierten Standard-Methode" der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie (J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 15 (1977), 249). Die Bestimmung des Creatinkinase-Isoenzyms CK-MB erfolgt vorzugsweise nach der immunologischen UV-Methode (Würzburg U. et al., Klin. Wschr. 54 (1976), 357).

Die Bestimmung von Lactat-Dehydrogenase (LDH) oder des Lactat-Dehydrogenase Isoenzyms (HBDH) (1-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase) erfolgt vorzugsweise nach der "Optimierten Standard-Methode" der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (Z.Klin. Chem.Klin.Biochem. 8 (1970), 658 und 10 (1972), 182).

Als Probe wird beim erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise eine Serum- oder Plasmaprobe eingesetzt, insbesondere eine humane Serum- oder Plasmaprobe.

Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß es in einem Analyseautomaten durchgeführt werden kann, z. B. an einem Boehringer Mannheim/Hitachi 704- oder 717-Analysegerät. Bei derartigen Analysegeräten können ohne weiteres die besonders bevorzugten Nebenmeßwellenlängen von 546 bzw. 570 nm eingestellt werden.

Weiterhin wird die Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele erläutert:

Allgemeine Methoden

Ein Teil eines Serumpools wurde mit einer Hämoglobin-haltigen Lösung derart versetzt, daß ein Hämoglobingehalt von 2.000 mg/dl erreicht wurde. Ein anderer, gleich großer Teil des Serumpools wurde mit der äquivalenten Menge einer NaCl-Lösung (154 mmol/l) versetzt. Beide Teile wurden anschließend in unterschiedlichem Verhältnis derart miteinander vermischt, daß eine Hb-Konzentrationsreihe aus 11 Proben entstand, wobei eine Probe kein Hb und die höchste Probe 2.000 mg/dl Hb enthielt.

Beispiel 1

Bestimmung von Ammoniak

Die Bestimmung wurde an einem Boehringer Mannheim/Hitachi 717-Analysegerät durchgeführt. Es wurden folgende Reagenzien verwendet:

Reagenz 1: 150 mmol/l Triethanolamin-Puffer, pH 8,6; 15 mmol/l α -Ketoglutarat; 1,5 mmol/l ADP

Reagenz 2: 150 mmol/l Triethanolamin-Puffer; pH 8,6; 15 mmol/l α -Ketoglutarat; 1,5 mmol/l ADP; 0,31 mmol/l NADPH; ≥ 24 U/ml Glutamat-Dehydrogenase (GLDH).

Die Testdurchführung war wie folgt: Zu 20 μ l Probe wurden 200 μ l Reagenz 1 und nach 5 min 50 μ l Reagenz 2 gegeben. Die Bestimmung des Analyten erfolgte nach einer Dauer von weiteren 40 sec. Zur Messung wurden eine Hauptmeßwellenlänge von 340 nm und Nebenmeßwellenlängen von 405 nm, 480 nm, 505 nm, 600 nm, 660 nm und 700 nm (Vergleich) sowie von 546 nm und 570 nm (Erfindung) verwendet.

Das Ergebnis dieser Bestimmung ist in Tabelle 1 gezeigt. Es ist zu erkennen, daß bei Verwendung der erfindungsgemäßen Meßwellenlängen von 546 bzw. 570 nm eine deutlich verbesserte Wiederfindung (recovery) als bei den anderen Meßwellenlängen erreicht wurde.

Beispiel 2

Bestimmung von Creatinkinase

Die Bestimmung wurde an einem Boehringer Mannheim/Hitachi 717-Analysegerät durchgeführt. Es wurden folgende Reagenzien verwendet:

Reagenz 1: 110 mmol/l Imidazol-Puffer; pH 6,7; 20,5 mmol/l Glucose; 2,05 mmol/l EDTA; 2,5 mmol/l ADP; 6,1 mmol/l AMP; 12 μ mol/l Diadenosinpentaphosphat; 2,5 mmol/l NADP; 25 mmol/l N-Acetylcystein; $\geq 3,1$ U/ml Hexokinase (HK); $\geq 1,8$ U/ml Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH)

Reagenz 2: 25 mmol/l Imidazol-Puffer; pH 7,5; 20,5 mmol/l Glucose; 2,05 mmol/l EDTA; 61 mmol/l Mg^{2+} ; 184 mmol/l Creatinphosphat.

Die Testdurchführung war wie folgt: Zu 7 μ l Probe wurden 250 μ l Reagenz 1 und nach 5 min 50 μ l Reagenz 2 gegeben. Die Bestimmung des Analyten erfolgte nach einer Dauer von weiteren 2 min. Zur Messung wurden eine Hauptmeßwellenlänge von 340 nm und Nebenmeßwellenlängen von 405 nm, 480 nm, 505 nm, 600 nm, 660 nm und 700 nm (Vergleich) sowie von 546 nm und 570 nm (Erfindung) verwendet.

Das Ergebnis dieser Bestimmung ist in Tabelle 2 gezeigt. Es ist zu erkennen, daß bei Verwendung der erfindungsgemäßen Meßwellenlängen von 546 bzw. 570 nm eine deutlich verbesserte Wiederfindung (recovery) als bei den anderen Meßwellenlängen erreicht wurde.

Beispiel 3

Bestimmung des Creatinkinase-Isoenzyms CK-MB

Die Bestimmung wurde an einem Boehringer Mannheim/Hitachi 717-Analysegerät durchgeführt. Es wurden folgende Reagenzien verwendet:

Reagenz 1 : 110 mmol/l Imidazol-Puffer; pH 6,7; 21 mmol/l Glucose; 11 mmol/l Mg^{2+} ; 2,1 mmol/l EDTA; 2,4 mmol/l ADP; 6,0 mmol/l AMP; 12 μ mol/l Diadenosinpentaphosphat; 2,4 mmol/l NADP; 24 mmol/l N-Acetylcystein; $\geq 3,0$ U/ml HK; $\geq 1,8$ U/ml G6P-DH; Antikörper, Hemmkapazität gegen CK-M bis 2000 U/l

Reagenz 2: 110 mmol/l Imidazol-Puffer; pH 6,7; 21 mmol/l Glucose; 2,1 mmol/l EDTA; 11 mmol/l Mg^{2+} ; 186 mmol/l Creatinphosphat.

Die Testdurchführung war wie folgt: Zu 12 μ l Probe wurden 250 μ l Reagenz 1 und nach 5 min 50 μ l Reagenz 2 gegeben. Die Bestimmung des Analyten erfolgte nach einer Dauer von weiteren 3 min. Zur Messung wurden eine Hauptmeßwellenlänge von 340 nm und Nebenmeßwellenlängen von 405 nm, 480 nm, 505 nm, 600 nm, 660 nm und 700 nm (Vergleich) sowie von 546 nm und 570 nm (Erfindung) verwendet.

Das Ergebnis dieser Bestimmung ist in Tabelle 3 gezeigt. Es ist zu erkennen, daß bei Verwendung der erfindungsgemäßen Meßwellenlängen von 546 bzw. 570 nm eine deutlich verbesserte Wiederfindung (recovery) als bei den anderen Meßwellenlängen erreicht wurde.

Beispiel 4

Bestimmung von Lactat-Dehydrogenase

Die Bestimmung wurde an einem Boehringer Mannheim/Hitachi 717-Analysegerät durchgeführt. Es wurden folgende Reagenzien verwendet:

Reagenz 1: 68 mmol/l Phosphat-Puffer; pH 7,5; $\geq 0,73$ mmol/l Pyruvat

Reagenz 2: $\geq 1,1$ mmol/l NADH.

Die Testdurchführung war wie folgt: Zu 5 μ l Probe wurden 250 μ l Reagenz 1 und nach 5 min 50 μ l Reagenz 2 gegeben. Die Bestimmung des Analyten erfolgte nach einer Dauer von weiteren 60 sec. Zur Messung wurden eine Hauptmeßwellenlänge von 340 nm und Nebenmeßwellenlängen von 405 nm, 480 nm, 505 nm, 600 nm, 660 nm und 700 nm (Vergleich) sowie von 546 nm und 570 nm (Erfindung) verwendet.

Das Ergebnis dieser Bestimmung ist in Tabelle 4 gezeigt. Es ist zu erkennen, daß bei Verwendung der erfindungsgemäßen Meßwellenlängen von 546 bzw. 570 nm eine deutlich verbesserte Wiederfindung (recovery) als bei den anderen Meßwellenlängen erreicht wurde.

Beispiel 5

Bestimmung des LDH-Isoenzym HBDH

Die Bestimmung wurde an einem Boehringer Mannheim/Hitachi 717-Analysegerät durchgeführt. Es wurden folgende Reagenzien verwendet:

Reagenz 1: 68 mmol/l Phosphat-Puffer; pH 7,5; 3,7 mmol/l α -Oxobutyrat

Reagenz 2: $\geq 1,1$ mmol/l NADH.

Die Testdurchführung war wie folgt: Zu 5 μ l Probe wurden 250 μ l Reagenz 1 und nach 5 min 50 μ l Reagenz 2 gegeben. Die Bestimmung des Analyten erfolgte nach einer Dauer von weiteren 60 sec. Zur Messung wurden eine Hauptmeßwellenlänge von 340 nm und Nebenmeßwellenlängen von 405 nm, 480 nm, 505 nm, 600 nm, 660 nm und 700 nm (Vergleich) sowie von 546 nm und 570 nm (Erfindung) verwendet.

Das Ergebnis dieser Bestimmung ist in Tabelle 5 gezeigt. Es ist zu erkennen, daß bei Verwendung der erfindungsgemäßen Meßwellenlängen von 546 bzw. 570 nm eine deutlich verbesserte Wiederfindung (recovery) als bei den anderen Meßwellenlängen erreicht wurde.

Tabelle 1

Probe	Hb-Gehalt [mg/dl]	Gehalt bei 405 nm [µg/dl]	Gehalt bei 490 nm [µg/dl]	Gehalt bei 506 nm [µg/dl]	Gehalt bei 546 nm [µg/dl]	Gehalt bei 570 nm [µg/dl]	Gehalt bei 600 nm [µg/dl]	Gehalt bei 660 nm [µg/dl]	Gehalt bei 700 nm [µg/dl]
1	0	157	163	160	159	158	154	158	154
2	200	145	162	162	157	156	150	157	155
3	400	140	165	163	162	150	162	150	160
4	600	133	166	162	161	153	163	162	161
5	800	145	172	171	164	150	160	166	158
6	1000	144	173	172	162	155	160	171	167
7	1200	160	171	175	167	156	175	166	164
8	1400	150	177	177	166	155	177	171	170
9	1600	176	180	178	162	152	178	170	180
10	1800	175	183	177	163	157	188	180	183
11	2000	178	189	192	172	159	199	190	187

Probe	Hb-Gehalt [mg/dl]	Recovery 405 nm [%]	Recovery 490 nm [%]	Recovery 506 nm [%]	Recovery 546 nm [%]	Recovery 570 nm [%]	Recovery 600 nm [%]	Recovery 660 nm [%]	Recovery 700 nm [%]
1	0	100	100	100	100	100	100	100	100
2	200	92	90	101	99	99	103	99	101
3	400	89	101	102	102	100	105	100	104
4	600	85	102	101	101	97	106	103	105
5	800	92	106	107	103	100	109	105	103
6	1000	92	106	108	102	98	109	108	108
7	1200	102	105	109	105	99	114	105	106
8	1400	101	109	111	104	98	115	108	110
9	1600	112	110	111	102	96	116	113	117
10	1800	111	112	111	103	100	122	114	119
11	2000	113	116	120	108	101	129	120	121

Tabelle 2

Probe	Hb-Gehalt [mg/dl]	Gehalt bei 405 nm [U/l]	Gehalt bei 480 nm [U/l]	Gehalt bei 505 nm [U/l]	Gehalt bei 546 nm [U/l]	Gehalt bei 570 nm [U/l]	Gehalt bei 600 nm [U/l]	Gehalt bei 660 nm [U/l]	Gehalt bei 700 nm [U/l]
1	0	175	175	177	175	177	176	179	174
2	200	181	176	177	175	180	176	180	178
3	400	188	177	179	178	180	176	179	178
4	600	182	165	165	168	171	165	170	166
5	800	191	164	166	168	170	162	166	166
6	1000	195	164	164	170	172	163	166	163
7	1200	196	163	164	170	174	163	166	165
8	1400	205	163	163	170	174	160	165	164
9	1600	212	163	163	173	174	161	164	162
10	1800	214	160	163	172	177	161	165	163
11	2000	224	160	161	173	178	160	164	164

Probe	Hb-Gehalt [mg/dl]	Recovery 405 nm [%]	Recovery 480 nm [%]	Recovery 505 nm [%]	Recovery 546 nm [%]	Recovery 570 nm [%]	Recovery 600 nm [%]	Recovery 660 nm [%]	Recovery 700 nm [%]
1	0	100	100	100	100	100	100	100	100
2	200	103	101	100	100	102	100	101	102
3	400	106	101	101	102	102	100	100	102
4	600	104	94	93	96	97	94	95	95
5	800	109	94	94	96	96	92	93	95
6	1000	111	94	93	97	97	93	93	94
7	1200	112	93	93	97	98	93	93	95
8	1400	117	93	92	97	98	91	92	94
9	1600	121	93	92	99	98	91	92	93
10	1800	122	91	92	98	100	91	92	94
11	2000	128	91	91	99	101	91	92	94

Tabelle 3

Probe	Hb-Gehalt [mg/dl]	Gehalt bei 405 nm [U/l]	Gehalt bei 480 nm [U/l]	Gehalt bei 505 nm [U/l]	Gehalt bei 546 nm [U/l]	Gehalt bei 570 nm [U/l]	Gehalt bei 600 nm [U/l]	Gehalt bei 660 nm [U/l]	Gehalt bei 700 nm [U/l]
1	0	40,6	40,2	40,7	41,5	40,1	40,7	40,8	38,1
2	200	49,7	41,2	39,4	40,7	42,6	39,1	39,7	37,0
3	400	58,9	37,3	38,2	41,0	41,6	38,8	38,0	37,2
4	600	68,1	38,5	36,8	43,1	40,8	38,1	37,7	36,5
5	800	75,3	36,6	35,7	42,6	42,4	32,7	36,3	32,5
6	1000	82,4	34,9	35,4	44,1	43,4	30,8	32,6	36,5
7	1200	82,5	30,6	33,0	44,4	44,5	27,5	36,7	32,8
8	1400	95,0	35,5	34,5	44,8	43,0	26,1	33,4	33,9
9	1600	99,2	37,3	35,0	44,1	44,3	25,9	31,7	29,4
10	1800	98,9	33,9	29,8	46,7	42,9	24,8	27,1	29,4
11	2000	97,1	33,2	29,1	48,1	44,1	22,4	27,9	29,9

Probe	Hb-Gehalt [mg/dl]	Recovery 405 nm [%]	Recovery 480 nm [%]	Recovery 505 nm [%]	Recovery 546 nm [%]	Recovery 570 nm [%]	Recovery 600 nm [%]	Recovery 660 nm [%]	Recovery 700 nm [%]
1	0	100	100	100	100	100	100	100	100
2	200	122	102	97	98	106	98	97	99
3	400	145	93	94	101	104	95	88	98
4	600	160	96	90	104	102	89	92	96
5	800	185	91	88	103	106	80	89	85
6	1000	203	87	87	106	108	76	80	96
7	1200	203	98	83	107	111	68	90	86
8	1400	234	88	85	108	107	64	82	89
9	1600	244	93	86	106	110	64	78	77
10	1800	244	84	73	113	107	61	66	77
11	2000	230	83	71	116	110	55	68	78

Tabelle 4

Probe	Iib-Gehalt [mg/dl]	Gehalt bei 405 nm [U/l]	Gehalt bei 480 nm [U/l]	Gehalt bei 505 nm [U/l]	Gehalt bei 546 nm [U/l]	Gehalt bei 570 nm [U/l]	Gehalt bei 600 nm [U/l]	Gehalt bei 660 nm [U/l]	Gehalt bei 700 nm [U/l]
1	0	196	197	199	197	199	199	199	205
2	200	162	202	206	203	198	208	200	206
3	400	127	210	215	199	195	219	207	215
4	600	95	218	223	202	196	229	217	224
5	800	72	220	228	200	192	225	222	222
6	1000	45	224	226	199	193	230	226	222
7	1200	27	223	232	201	190	236	228	233
8	1400	11	237	240	203	192	243	234	236
9	1600	-13	230	238	199	190	242	233	236
10	1800	-1	234	244	198	192	245	237	238
11	2000	-15	233	246	197	191	247	230	241

Probe	Iib-Gehalt [mg/dl]	Recovery 405 nm [%]	Recovery 480 nm [%]	Recovery 505 nm [%]	Recovery 546 nm [%]	Recovery 570 nm [%]	Recovery 600 nm [%]	Recovery 660 nm [%]	Recovery 700 nm [%]
1	0	100	100	100	100	100	100	100	100
2	200	93	103	104	103	99	104	101	100
3	400	65	107	108	101	98	110	104	105
4	600	48	111	112	103	98	115	109	109
5	800	37	112	115	102	96	113	112	108
6	1000	23	114	114	101	97	116	114	108
7	1200	14	113	117	102	95	119	115	114
8	1400	6	120	121	103	96	122	118	115
9	1600	-7	117	120	101	95	122	117	115
10	1800	-1	119	123	101	96	123	119	116
11	2000	-8	118	124	100	96	124	120	118

Tabelle 5

Probe	Hb-Gehalt [mg/dl]	Gehalt bei 405 nm [U/l]	Gehalt bei 480 nm [U/l]	Gehalt bei 505 nm [U/l]	Gehalt bei 546 nm [U/l]	Gehalt bei 570 nm [U/l]	Gehalt bei 600 nm [U/l]	Gehalt bei 660 nm [U/l]	Gehalt bei 700 nm [U/l]
1	0	88,0	93,4	93,8	92,6	90,8	92,1	93,0	91,0
2	200	83,5	91,1	99,4	97,4	90,3	94,3	91,9	93,1
3	400	68,5	95,0	97,5	90,6	92,5	95,6	87,1	99,3
4	600	58,0	97,0	98,7	94,4	90,2	97,6	103,6	99,4
5	800	45,0	100,2	99,1	91,3	85,6	94,2	100,7	103,0
6	1000	30,6	101,8	101,5	91,4	92,3	105,3	100,9	99,4
7	1200	30,1	101,4	101,1	90,3	87,8	104,7	98,0	100,8
8	1400	18,0	101,4	104,8	92,0	91,6	104,9	109,3	104,6
9	1600	22,8	104,0	104,4	94,9	90,3	103,0	99,4	104,7
10	1800	20,2	102,0	102,2	91,9	94,3	102,8	106,8	94,0
11	2000	10,7	103,4	102,7	91,8	89,2	100,3	108,2	102,0

Probe	Hb-Gehalt [mg/dl]	Recovery 405 nm [%]	Recovery 480 nm [%]	Recovery 505 nm [%]	Recovery 546 nm [%]	Recovery 570 nm [%]	Recovery 600 nm [%]	Recovery 660 nm [%]	Recovery 700 nm [%]
1	0	100	100	100	100	100	100	100	100
2	200	95	98	106	105	99	102	99	102
3	400	78	102	104	98	102	104	94	109
4	600	66	104	105	102	99	106	111	109
5	800	51	107	106	99	94	102	108	113
6	1000	44	109	108	99	102	114	109	109
7	1200	43	109	108	98	97	114	105	111
8	1400	20	100	112	99	101	114	118	115
9	1600	26	111	111	102	99	112	107	115
10	1800	23	110	109	99	104	112	115	103
11	2000	21	111	110	99	98	109	114	112

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer freies Hämoglobin enthaltenden Probe durch optische bichromatische Messung bei einer Haupt- und einer Nebenmeßwellenlänge, **dadurch gekennzeichnet**, daß man eine Nebenmeßwellenlänge von oberhalb 475 nm verwendet, bei der sich Absorptionsbanden von Hämoglobin befinden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nebenmeßwellenlänge im Bereich von 546 ± 10 nm verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nebenmeßwellenlänge im Bereich von 570 ± 10 nm verwendet.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1—3, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Test durchführt, der auf einer Messung der Zu- oder Abnahme der Konzentration von NADH oder NADPH in der Probe beruht.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Hauptmeßwellenlänge im Bereich von 340 ± 10 nm verwendet.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1—5, dadurch gekennzeichnet, daß man den Gehalt eines Analyten bestimmt, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ammoniak, Creatinkinase und Isoenzymen davon und Lactat-Dehydrogenase und Isoenzymen davon.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Bestimmung von Ammoniak durchführt.
8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Bestimmung von Creatinkinase oder/und des Creatinkinase-Isoenzyms CK-MB durchführt.
9. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Bestimmung von Lactatdehydrogenase oder/und des Lactatdehydrogenase-Isoenzyms HBDH durchführt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1—9, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Probe bestimmt, die ein Blutersatzmittel enthält.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1—10, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung an einer Serum- oder Plasmaprobe durchgeführt wird.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1—11, dadurch gekennzeichnet, daß man die Bestimmung in einem Analyseautomaten durchführt.